

日本体育大学紀要 (Bull. of Nippon Sport Sci. Univ.), 39 (2), 137–141, 2010

【原著論文】

柔道場畳の細菌と真菌との相関性： 顕微鏡による真菌培養液の殺菌に関する検討

加藤 希

日本体育大学自然科学研究室

Electron microscopic studies on the bactericidal effect of the supernatant of fungal culture

Nozomi KATO

Abstract: We have investigated bacterial and fungal flora in *tatami* of *judo* training halls. When the count of bacteria increased the count of fungi decreased, and vice versa, mirror image phenomenon showing a correlation in their growth, on judo mats and wrestling mats as shown before. Each *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus warneri* and *Bacillus subtilis* was frequently isolated from *tatami* of *judo* training halls. In this study, to investigate the bactericidal effects of the supernatant of the fungal species isolated from *tatami* of *judo* training halls. Two (no. 4 and 6) were shake-cultured for 12 weeks, and then treated with bacteria with the supernatants, growth-inhibitory zones were formed in cultures of particular bacterial species. The results indicated the inhibition of bacterial growth in the fungal culture media, and also we observed the cell structures by a scanning and a transmission electron microscope. Based on the findings in this study, the results suggest that competition between bacteria and fungi in nutritional intake from mats for growing and the action of an antibiotic-like substance produced by fungi.

(Received: December 19, 2009 Accepted: January 7, 2010)

Key words: *tatami* of *judo* training halls, bacteria, fungi, bactericidal effect, microscope

キーワード：柔道場の畳, 細菌, 真菌, 殺菌効果, 顕微鏡

1. 目 的

先に、中村らは年間を通して、N 体育大学の柔道場の畳の微生物叢の個数の変化を追跡した¹⁾。その結果、畳から分離され真菌の個数が増加する時期には、細菌数が減少する現象がみられた。一方、真菌数の減少する時期には、細菌数が増加することが判った。同様の現象はレスリング場のマットでも報告されている²⁾。このような細菌と真菌との個数の増減が相互のミラーイメージを示す現象は、真菌の産生する抗菌物質によって細菌の増殖が阻止されるために起ることが推測される。

本研究は柔道場の畳から分離した真菌の培養液を用いて、高頻度に分離された細菌を処理し真菌培養液による細菌の殺菌効果について顕微鏡を用いて観察したものである。

2. 実験方法

1) 真菌培養液の調製

N 体育大学柔道場（塩化ビニル製畳）から分離された真菌を純培養し、サブロー液体培地（ペプトン 10.0 g/l, ブドウ糖 40.0 g/l）で 27°C, 12 週間、振盪培養³⁾（TAITEC, BR-300LF）を行った後、3000 rpm で 15 分間遠心し上清液を得た。上清液は、0.22 μm のメンブレンフィルター（Billerica, MA, USA）で濾過した後、-80°C で凍結し、2 日間、凍結乾燥機（Labconco Model 75035, Kansas City, MO, USA）で処理した。次に、それらを蒸留水に溶かし、凍結乾燥した真菌培養液（10 倍に濃縮）として実験に用いた。真菌培養液は 2 種の No. 4 と No. 6 を各々実験に供した。

2) 供試菌

年間を通して、柔道場の畳から高頻度に分離される

Micrococcus luteus, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus subtilis* の3菌種を実験に用いた⁴⁾。

3) グラム染色性の検討

各々の細菌は真菌培養液を用いて 27°C, 1 週間の処理を行った後、遠心分離機で集菌し沈査をグラム染色し、光学顕微鏡を用いて細菌のグラム染色性について観察した。

4) 走査型電子顕微鏡の試料作製

真菌培養液による処理後、遠心分離機で集菌し上清を取り除き 0.1 M のリン酸緩衝液を用いて 2 回洗浄した。洗浄後の菌液に最終濃度が 2.5% になるようにグルタルアルデヒドを添加し、4°C, 2 時間固定を行った。次に、菌液から固定液をパスツールピペットで取り除き、エタノールで脱水処理を行った。すなわち、それ

ぞれ 50–80% シリーズで 4°C, 10 分間, 90% では室温で 10 分間, 100% は室温で 10 分間の脱水を 3 回行った。次に、細菌を酢酸イソamil に 15 分間浸漬し、置換処理を行った。その後、臨界点乾燥装置 (JCPD-5, JEOL) により、液化炭酸ガスを用いて、試料を乾燥させ、オートファインコータ (JFC-1600, JEOL) で白金コーティング 30 mV, 90 秒を行い、走査型電子顕微鏡 (JSM-6460LV, JEOL) を用いて細菌の構造観察を行った。

5) 透過型電子顕微鏡の試料および超薄切片の作製

細菌を遠心分離機で集菌し、0.1 M のリン酸緩衝液を用いて 2 回洗浄した。上清を取り除いた後に、グルタルアルデヒド (濃度 2.5%) で 4°C, 24 時間前固定した。後固定は 1% の四酸化オスミウムにより、4°C, 1 時間化学固定を行った。次に、固定液をピペットで取り除き、2 回洗浄を行った後、寒天に包埋し、カミソ

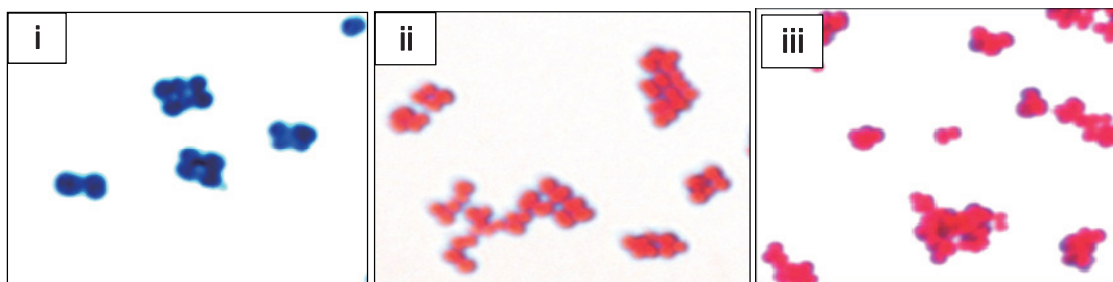


図 1-a *Micrococcus luteus* のグラム染色後の光学顕微鏡像。図 1-a, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い、27°C, 1 週間の処理を行った後の像を示している。

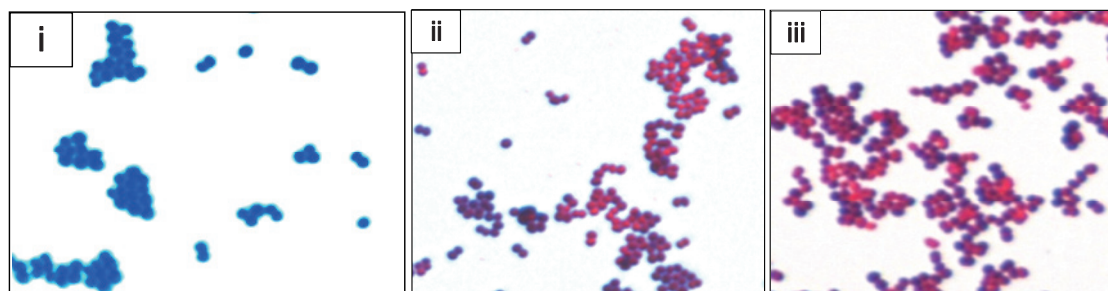


図 1-b *Staphylococcus warneri* のグラム染色後の光学顕微鏡像。図 1-b, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い、27°C, 1 週間の処理を行った後の像を示している。

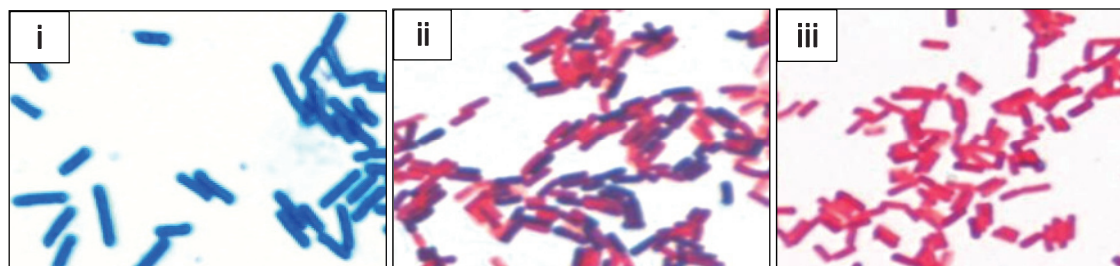


図 1-c *Bacillus subtilis* のグラム染色後の光学顕微鏡像。図 1-c, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い、27°C, 1 週間の処理を行った後の像を示している。

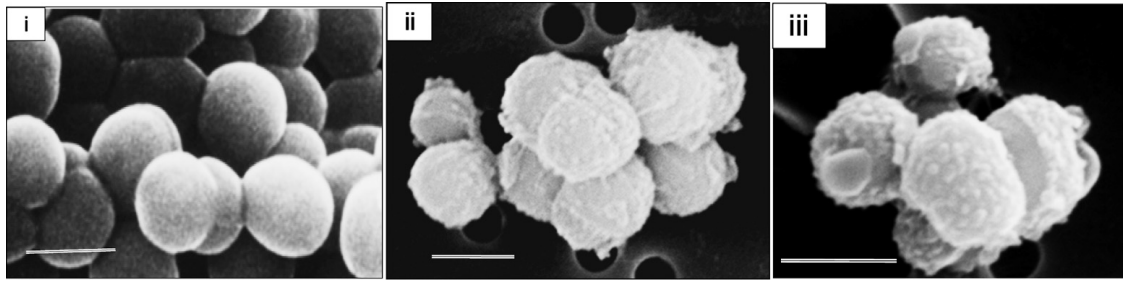


図 2-a *Micrococcus luteus* の走査型電子顕微鏡像。図 2-a, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い, 27°C, 1 週間の処理を行った後の菌体表面の像を示している。Bar=1 μm.

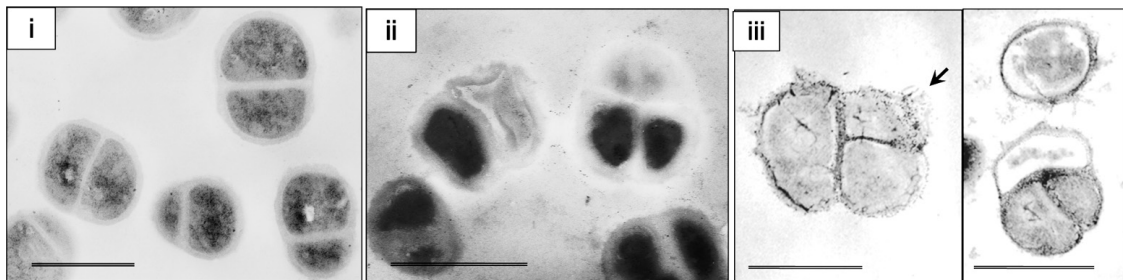


図 2-b *Micrococcus luteus* の透過型電子顕微鏡像。図 2-b, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い, 27°C, 1 週間の処理を行った後の細菌の内部構造の像を示している。Bar=1 μm.

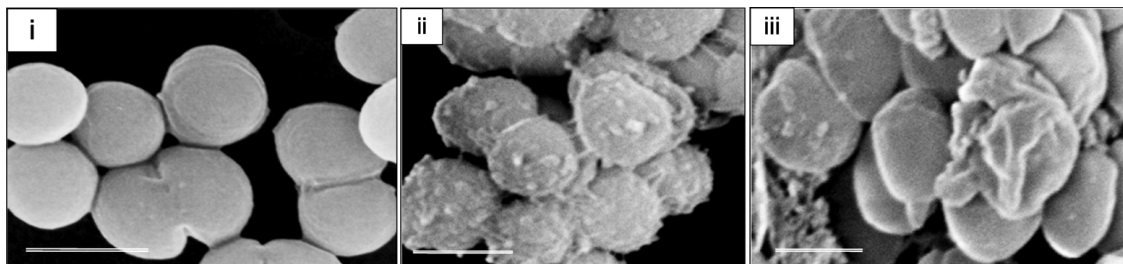


図 3-a *Staphylococcus warneri* の走査型電子顕微鏡像。図 3-a, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い, 27°C, 1 週間の処理を行った後の菌体表面の像を示している。Bar = 1 μm.

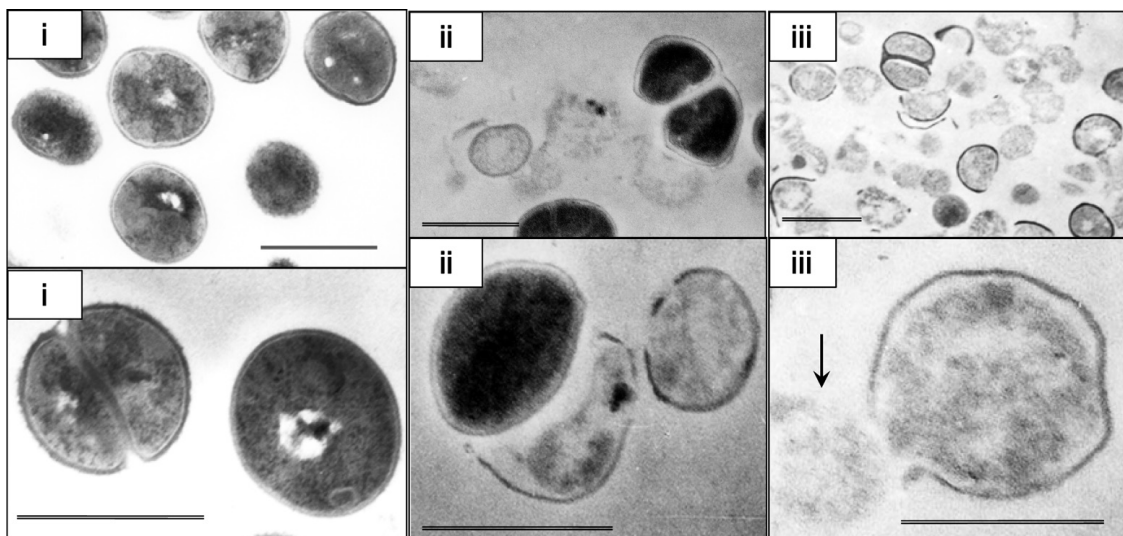


図 3-b *Staphylococcus warneri* の透過型電子顕微鏡像。図 3-b, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い, 27°C, 1 週間の処理を行った後の細菌の内部構造の像を示している。Bar = 1 μm.

りで1 mm³前後に細切りした。電子顕微鏡標本自動作製装置（HEM48, サクラファインテックジャパン）を用いて、エタノール（50%, 80%）で脱水した。次に、Spurr 樹脂（日新 EM 株式会社）に包埋し、70°C, 48 時間の加熱重合を行った。その後、試料を超ミクロトーム（LEICA ULTRACUT UCT）で厚さ約 60 nm に薄切した。

3. 結果および考察

図 1 は高頻度に分離、同定された *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus subtilis* の 3 菌種について、真菌培養液（No. 4, No. 6）で処理した後、グラム染色性の検討を行った結果である。*Micrococcus luteus* は被検液で処理をすると正常なグラム染色性が失われ（図 1-a）、菌体は陰性様の赤色に変化した。*Staphylococcus warneri* は図 1-b に示したように、染色性の変化とブドウ状の配列部分も確認された。*Bacillus*

subtilis では培養液によって染色性に差が見られた。No. 4 液処理後では陽性と陰性様に赤く染色されている部分とが混在することに対し、No. 6 液処理後では全体が赤色に染色され、グラム染色性の変化は No. 6 液の方が顕著にみられた。これらの事実から、被検液処理によって 3 菌種とも正常なグラム染色性が消失することが判った。すなわち、被検液で処理したことによって、細胞壁等に何らかの破壊があることが示唆された。

図 2-a は *Micrococcus luteus* の走査型電子顕微鏡像である。被検液処理前の菌体表面はスムーズである（図 i）。これに対して、被検液処理後の菌体は表面に粒状構造物の付着が顕著に観察された（図 ii, iii）。図 2-b は *Micrococcus luteus* の透過型電子顕微鏡像である。対照（図 i）と比較をしたところ、処理をした細菌の細胞質の電子密度は低下していた。また、図 iii で示す矢印のように、細胞壁に突起状構造物が観察されたことは、

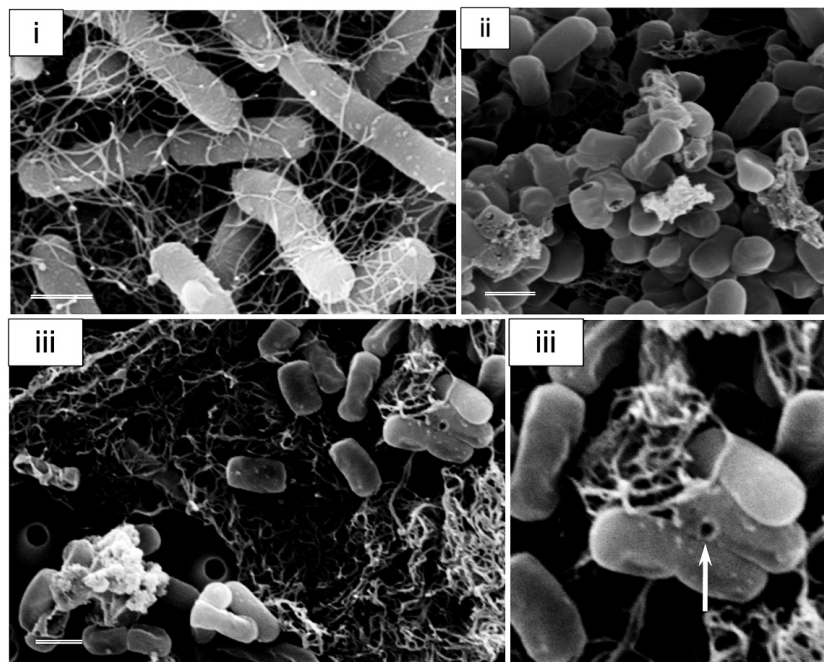


図 4-a *Bacillus subtilis* の走査型電子顕微鏡像。図 4-a, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い、27°C, 1 週間の処理を行った後の菌体表面の像を示している。Bar = 1 μm.

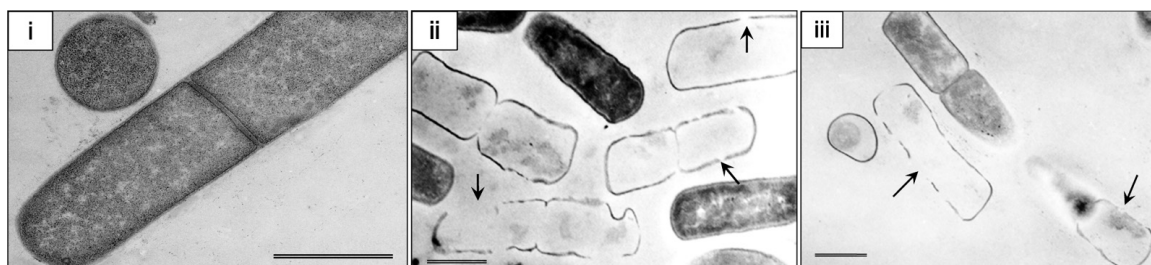


図 4-b *Bacillus subtilis* の透過型電子顕微鏡像。図 4-b, i) は被検液処理前の菌体, ii) は真菌培養液 No. 4 で処理した。iii) は No. 6 を用い、27°C, 1 週間の処理を行った後の細菌の内部構造の像を示している。Bar = 1 μm.

走査型電子顕微鏡像にみられる粒状構造物との整合性がみられた。*Staphylococcus warneri* の走査型電子顕微鏡像は図 3-a である。菌体表面がスムーズな球体である対照 (図 i) に対して、被検液処理後の菌体表面は歪んで粗状になり形態が著しく崩れていることが確認された (図 ii, iii)。透過型電子顕微鏡で対照 (図 i) の内部構造を観察した結果、正常な細胞壁と細胞質、核様体を有し、リボソーム顆粒の分布がほぼ均等に見られた。一方、被検液処理後は電子密度が全体的に低いことが分かる (図 ii, iii)。これは図 iii の矢印で示すように、細胞壁の部分的な破壊によって細胞質が外部へ流出し、細胞質の電子密度が低下したものと考えられる (図 3-b)。図 4-a は *Bacillus subtilis* の表面構造を示している。対照は栄養型で桿状形態を呈し、周毛性の鞭毛を有している (図 i)。これに対し、被検液処理を施した菌体では、一部で耐久型に変形したものが観察された (図 4-a, iii)。また、孔状構造や細胞壁の変形が観察された (図 ii)。さらに、鞭毛構造が消失していることが確認された。*Bacillus subtilis* の内部構造を観察すると、対照では電子密度が高く、細胞壁と細胞質、核様体や分裂前に見られるセプタムが観察された (図 4-b, i)。被検液処理後は菌体の電子密度が高く、細胞壁と細胞質を有する正常な細胞に近いものも観察された。一方、細胞質が殆ど見られない細胞には、孔状構造が多く観察された (図 ii, iii)。以上のように細胞質の電子密度に差位がみられた事実はグラム染色性の検討で示されたように、陽性と赤色の陰性に变化した菌体とが混在している結果と一致した。

4. 結 論

柔道場の畳より高頻度に分離、同定された *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus warneri*, *Bacillus subtilis*

の 3 菌種に対して真菌の培養液を被検液として殺菌効果を光学系、走査型、透過型電子顕微鏡を用いて形態学的に観察した。その結果、柔道場の畳から採取された真菌培養液は細菌の細胞構造に対して顕著な菌体の崩壊を起こすことが形態学的に確認された。この結果から、真菌の個数が増加する時期には、真菌の産生する抗菌様物質によって、細菌数の減少が起こっていることが示唆された。今後は、柔道場の畳から分離される真菌の培養液について抗菌様物質の生化学的な解析を行う必要があると思われる。

謝辞 本研究を御指導戴いた自然科学研究室 長船哲齊教授、柔道場での試料採取の御許可を戴いた運動方法 (柔道) 研究室 山本洋祐准教授に厚く御礼申し上げます。

5. 文 献

- 1) 中村 洋：柔道場における細菌叢の動態. 平成 17 年度日体大卒業研究抄録 2006.
- 2) 太田 祐一：レスリング・マットにおける細菌・真菌の動態. 平成 18 年度日体大卒業研究抄録 2007.
- 3) 奈良真孝, 田中和幸, 田辺 勝, 山本洋祐, 清原伸彦, 長船哲齊, 篠原信一：柔道場の細菌と真菌の相関性に関する研究. 日本体育学会第 58 回大会 (神戸大学) 2007.
- 4) M. Nara, H. Yamamoto, K. Shibata, N. Kiyohara, K. Makimura and T. Osafune: Correlation between Bacteria and Fungi on Judo Mats. Korean Journal of Microscopy, Vol. 38, No. 4, 1178–1179, 2008.

〈連絡先〉

著者名：加藤 希

住 所：横浜市青葉区鴨志田町 1221-1

所 属：日本体育大学自然科学研究室

E-mail アドレス：kato-13@nittai.ac.jp